

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 根岸 孝至

審査員一同は、平成14年1月31日、申請者により提出された論文「ムギネ酸類合成系の酵素遺伝子に関する研究」について審査を行った。全陸地の約25%を占める石灰質アルカリ土壌では、土壌中の鉄が水酸化第二鉄として沈殿し不溶態であるために、植物はこれを吸収できない。イネ科植物はムギネ酸類と総称されるキレーターを根から分泌して、三価の鉄を可溶化し、「鉄—ムギネ酸類」錯体として固有のトランスポーターにより吸収することによって必須元素である鉄を獲得する。鉄欠乏をシグナルとして、ムギネ酸の合成と分泌は飛躍的に上昇する。ムギネ酸類は、メチオニンを出発として、S-アデノシルメチオニン、ニコチアナミン、ケト体、デオキシムギネ酸、ムギネ酸、その他のムギネ酸類の順に生合成される。近年の研究により、ムギネ酸類生合成経路の酵素遺伝子はひとつの酵素を除いてすべて単離された。本論文は、唯一残されていた、ケト体からデオキシムギネ酸を生成する反応を触媒する酵素の遺伝子を単離することを目的とし、さらにイネ科植物の鉄欠乏耐性機構を分子レベルで解析するために、cDNAマイクロアレイ法を用いたオオムギの鉄欠乏誘導性遺伝子群の網羅的同定を試みている。また鉄欠乏誘導性の新規S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子を単離した。全体は5章から構成されている。

第1章では、序論として研究の背景、目的と意義について述べられている。

第2章では、ムギネ酸類生合成経路上の酵素遺伝子のうち、唯一単離されていなかったデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子のオオムギからの単離について述べられている。これまでの知見により、目的とする酵素は鉄欠乏誘導性のNAD(P)依存型還元酵素であることが明らかとなっている。そこで、この酵素がアルド・ケト還元酵素スーパーファミリーに属するものと仮定した。このファミリー内に存在するいくつかの保存されたアミノ酸配列のなかから2つの領域を選び、ディジェネレートプライマーを設計してPCRを行った。得られたPCR断片のうち、鉄欠乏で誘導されるものをノーザン解析により選抜し、そのPCR断片を用いて鉄欠乏オオムギ根cDNAライブラリーから候補遺伝子のスクリーニングを行った。得られたcDNAクローンを酵母に導入して、そのタンパク質産物がデオキシムギネ酸合成酵素活性を持つことを検定した。その結果、2つのデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の単離に成功した。ノーザン解析により、これらの遺伝子はオオムギにおいて鉄欠乏に応答してその発現が上昇し、鉄添加によってその発現が抑制された。本章における、デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子のクローニングの成功により、ムギネ酸合成経路上の酵素遺伝子がすべて単離されることとなった。

第3章では、cDNAマイクロアレイ法を用いた、オオムギの鉄欠乏誘導性遺伝子群の網羅的解析について記述している。イネゲノムプロジェクトにより提供された、8987個のイネESTクローンがスポットされたマイクロアレイを用いて、オオムギ根での遺伝子発現解析を行った。鉄欠乏により誘導されるオオムギ遺伝子群を明らかにするために、

鉄供給区と鉄欠乏区のおオムギ根からRNAを抽出し、蛍光ラベルしてハイブリダイゼーションを行った。鉄欠乏区の転写量が鉄供給区の2倍以上になっているものを鉄欠乏誘導性遺伝子とした。その結果、約200個の遺伝子が鉄欠乏誘導性として同定された。オオムギにおけるムギネ酸類の分泌は、顕著な日周性を示すことが明らかになっている。そこで、この分泌の日周変動にかかわる遺伝子群を明らかにするために、ムギネ酸分泌がピークに達している、明期開始後1時間半の午前11時と、ムギネ酸類を分泌していない午前1時の鉄欠乏オオムギ根からそれぞれRNAを抽出して、さらにマイクロアレイ解析を行った。鉄欠乏によって誘導され、また午前11時の転写量が、午前1時の転写量の2倍となっている遺伝子をムギネ酸類分泌の日周変動にかかわる遺伝子とした。その結果、約50個の遺伝子が得られた。50個のうちの5個について、その転写量の24時間の経時変化をノーザン解析により調べたところ、このすべての遺伝子は、明期開始まで転写量は増加し続け、明期開始と同時に転写量は減少しており、発現に日周変動を示すことが明らかとなった。これらの遺伝子の機能から、ムギネ酸類分泌の日周変動には、オオムギ根細胞内における極性小胞輸送が関与している可能性が示された。以上の結果、これまで知られていなかった200個近い遺伝子が鉄欠乏により誘導されることが明らかになった。これらの遺伝子群の機能を解明することにより、オオムギの鉄欠乏耐性機構が分子レベルで明らかにされると考えられる。また、ムギネ酸類分泌の日周変動が極性小胞輸送によって制御されている可能性が示されたことは、イネ科植物の鉄獲得機構研究ばかりではなく、植物の細胞生物学の分野においても新しい展開をもたらすことが期待される成果である。

第4章では、鉄欠乏によって誘導されるS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子のオオムギからの単離が述べられている。第3章におけるマイクロアレイ解析によって得られた鉄欠乏誘導性遺伝子群のなかに、S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が含まれていた。S-アデノシルメチオニン合成酵素は、ムギネ酸類合成経路の最初の酵素として大変重要であり、これまでにオオムギのS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子は3種類単離されている。しかし、そのいずれも鉄欠乏による発現の誘導がみられなかった。このことは、未同定の新たなS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子がオオムギに存在することを意味していた。そこで鉄欠乏によって発現が誘導されるS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子をオオムギから単離することを目指した。その結果、2種類の候補遺伝子が得られた。これまで、ムギネ酸合成経路上の酵素遺伝子のうち、S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子だけが鉄欠乏によって誘導されないと考えられてきたが、本章の結果により、鉄欠乏によって誘導されるS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が存在することが明らかになった。第2章の結果とあわせると、ムギネ酸合成経路上の酵素遺伝子のすべてが鉄欠乏によって誘導されることが明らかとなった。

第5章では、得られた結果をもとに総合考察を行っている。

以上のように、本論文は、これまでムギネ酸合成経路上で唯一未同定だったデオキシムギネ酸合成酵素の遺伝子の単離に成功し、また200個近くの新規鉄欠乏誘導性遺伝子を明かにし、さらにムギネ酸類分泌の分子機構解明への手がかりを示した新規性と独創性に富む内容であり、今後の研究の発展に大いに貢献することが期待される。よって審査員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。